

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 9/16	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/48479 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. September 1999 (30.09.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01625 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. März 1999 (12.03.99) (30) Prioritätsdaten: 198 13 010.4 25. März 1998 (25.03.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAYER, Uwe [DE/DE]; Inningerstrasse 43c, D-86179 Augsburg (DE). HAHN, Bernd [DE/DE]; Friedrichsfelder Ring 16, D-65597 Hünfelden (DE). MAJERES, Anna [DE/DE]; Carl-von-Weinberg-Strasse 1, D-60320 Frankfurt am Main (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG; Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K 801, D-65926 Frankfurt am Main (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: SLOW RELEASE MICROCAPSULES (54) Bezeichnung: MIKROKAPSELN MIT VERZÖGERTEM RELEASE (57) Abstract <p>The inventive method for producing microcapsules is characterised in that a) in one step, liquid drops of an aqueous solution (1) containing at least one water-soluble polyanion are added to an aqueous solution (2) containing the following: 0.1 to 5 wt. % calcium cations; and 0.1 to 5 wt. % hydrolyzed chitosan with a number average molecular weight of between 2,200 and 40,000 g/mol., obtained by partial hydrolysis of a chitosan with a number average molecular weight of more than 50,000 g/mol. in an aqueous solution containing 0.1 to 4 N HCl at a temperature of between 50 and 95 °C for 0.5 to 8 hours, the weight ratio of the solution containing HCl to usual commercial chitosan being between 1 and 50 and the product of normality of the HCl solution and the duration of hydrolysis in hours being between 0.1 and 7; and in that b) once the addition of solution 1 is complete, the resulting microcapsules remain in solution 2 for a duration of 15 to 360 minutes, preferably 60 to 180 minutes.</p> (57) Zusammenfassung <p>Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, dadurch gekennzeichnet, daß a) in einem Verfahrensschritt Flüssigkeitströpfchen einer wäßrigen Lösung (1), die mindestens ein wasserlösliches Polyanion enthält, in eine wäßrige Lösung (2) eingebracht werden, enthaltend: 0,1 bis 5 Gew.-% Calciumkationen; und 0,1 bis 5 Gew.-% hydrolysiertes Chitosan mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht zwischen 2.200 und 40.000 g/mol, erhältlich durch partielle Hydrolyse eines Chitosans mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht von mehr als 50.000 g/mol in einer wäßrigen, 0,1 bis 4 N HCl enthaltenden Lösung bei einer Temperatur zwischen 50 und 95 °C für eine Dauer zwischen 0,5 und 8 Stunden, wobei das Gewichtsverhältnis von HCl enthaltender Lösung zu handelsüblichem Chitosan zwischen 1 und 50 liegt und das Produkt von Normalität der HCl-Lösung und der Hydrolysedauer in Stunden zwischen 0,1 und 7 liegt; und b) nach Beendigung der Zugabe der Lösung 1 für eine Dauer von 15 bis 360 Minuten, insbesondere für eine Dauer von 60 bis 180 Minuten, die so erhaltenen Mikrokapseln in der Lösung (2) verbleiben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Mikrokapseln mit verzögertem Release

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Mikrokapseln mit einem stark verzögerten Release der Wirkstoffe.

Unter dem Begriff Mikrokapseln versteht man Kapseln in einer Größe von 50 nm bis
10 3 mm, die eine äußere Hülle aus Polymeren und eine innere, meist flüssige Phase aufweisen. Mikrokapseln werden üblicherweise durch Einkapselung feindisperser flüssiger Phasen durch Umhüllung mit filmbildenden Polymeren hergestellt. Solche Mikrokapseln finden vor allem auf dem Gebiet von Depotpräparaten Anwendung, demzufolge der in der inneren Phase der Mikrokapseln befindliche Wirkstoff durch
15 die Hülle der Mikrokapsel geschützt ist und nicht sofort, sondern erst mit einem verzögerten Release (Wirkstofffreisetzung), freigesetzt wird.

Es ist bekannt, Mikrokapseln durch Zerstäuben einer organischen Polymer-Lösung herzustellen, wobei die auf diese Weise hergestellten Flüssigkeitströpfchen in ein
20 Fällbad eingesprüht werden.

So beschreibt die US-A-4 352 883 einen 2-Stufen-Prozeß zur Herstellung von Mikrokapseln, in denen lebende Zellen, wie z.B. Langerhans'sche Inselzellen, verkapselt werden. Hierzu werden die lebenden Zellen in Natriumalginat suspendiert und diese
25 Suspension in ein Fällbad gesprüht, das mehrwertige Kationen (beispielsweise Ca^{2+}) enthält. Hierbei kommt es an der Grenzfläche zur physikalischen Vernetzung des Alginats durch das mehrwertige Kation. Im zweiten Schritt werden die so hergestellten Kapseln mit einem kationischen Polymer gemischt, was eine weitere physikalische Vernetzung bewirkt. Als Polykationen werden in dieser Druckschrift Poly-
30 ethylenimin und Polylysin genannt.

Diese Kapseln sind für Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als

100.000 g/mol vollständig durchlässig. Es gibt folglich keinen verzögerten Release dieser Substanzen.

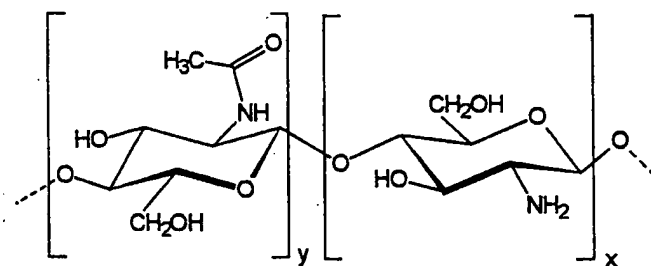
Die US-A-5 389 379 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, bei dem die mittels einer Ultraschalldüse hergestellten Flüssigkeitströpfchen zuerst in eine Flüssigkeit eingebracht werden, in der die Flüssigkeitströpfchen nicht löslich sind (beispielsweise in Ethanol). Anschließend wird diese Flüssigkeit durch Wasser ersetzt, um die Mikrokapseln zu vernetzen.

Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß der zu verkapselnde Wirkstoff zusammen mit dem filmbildenden Polymer in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden muß. Dies schränkt die Auswahl an Wirkstoffen aufgrund ihrer Löslichkeit und möglicher Denaturierung durch das Lösungsmittel erheblich ein.

Weiter ist bekannt, zur Herstellung von Mikrokapseln Chitosan zu verwenden. Chitosan ist der allgemeine Begriff für ein Polymer, das durch Deacetylierung von Chitin, einem unverzweigten $\beta(1-4)$ -verknüpften Polysaccharid von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose (N-Acetyl-D-glucosamin), erhältlich ist.

Chitosan kann durch folgende Formel beschrieben werden,

20



wobei das Verhältnis von deacetylierten zu acetylierten Segmenten größer als 1 ist und das zahlenmittlere Molekulargewicht zwischen 50.000 und mehreren Millionen g/mol beträgt. Dieses Chitosan ist in Wasser unlöslich und kann beispielsweise von der Firma Fluka bezogen werden.

So beschreiben C.A. McKnight et al. in Journal of Bioactive and Compatible Poly-

mers, Vol. 3, 1988, S. 334 bis 355 ein dreistufiges Verfahren zur Herstellung von Mikrokapselfn auf Basis von Alginat und Chitosan. Entsprechend diesem Verfahren wird zuerst die den Wirkstoff enthaltende Alginatlösung in eine Calciumchloridlösung eingebracht, wo eine erste Härtung der äußeren Kapseloberfläche stattfindet. Anschließend werden die gehärteten Kapseln mit einer Chitosanlösung überzogen, was zu einer Vernetzung der äußeren Hülle führt. Zuletzt werden die auf diese Weise erhaltenen Mikrokapselfn mit Alginat nachgewaschen. Das in dieser Druckschrift verwendete Chitosan weist ein zahlenmittleres Molekulargewicht von 160.000 bis 330.000 auf. Permeabilitätsuntersuchungen dieser Chitosan/Alginat-Membranen haben gezeigt, daß das Molekulargewicht des verwendeten Chitosans keinen signifikanten Einfluß auf das Permeationsverhalten verschiedener Proteine hat. Bereits nach zwei Stunden sind schon 20 % des Wirkstoffes BSA in die Chitosan enthaltenden Mikrokapselfn eindiffundiert.

Der Release dieser Mikrokapselfn ist bereits nach geringer Zeit schon sehr hoch.

15

A. Polk et al. berichten in "Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules" in Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994, S. 178 bis 185 über den Einfluß des Molekulargewichts von Chitosan in Mikrokapselfn. Das in diesen Versuchen verwendete Chitosan hat ein Molekulargewicht von 250.000 bis 1.250.000. Diese Untersuchungen zeigen, daß ein Anstieg des Molekulargewichts des verwendeten Chitosans mit einer Abnahme des Release des Wirkstoffes Albumin einhergeht. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß ein höheres Molekulargewicht des Chitosans zu den besten Ergebnissen in bezug auf einen verzögerten Release des Wirkstoffes führt.

Der Release dieser Mikrokapselfn beträgt nach 24 Stunden bereits 50 % des verkapselten Wirkstoffes.

Ein Nachteil der bekannten Verfahren zur Herstellung von chitosanhaltigen Mikrokapselfn ist, daß die Herstellung in zwei oder mehreren unterschiedlichen Arbeitsschritten erfolgt. Vor allem die Beförderung der Mikrokapselfn von dem einen Reaktionsbehälter in das andere erfordert aufwendige Vorrichtungen, vor allem wenn kleine Mikrokapselfn hergestellt werden sollen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von Mikrokapseln, die gegenüber dem bekannten Stand der Technik einen verzögerten Release der Wirkstoffe aufweisen. Darüber hinaus sollen diese Mikrokapseln einfach herzustellen sein.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, dadurch gekennzeichnet, daß

a) in einem Verfahrensschritt Flüssigkeitströpfchen einer wäßrigen Lösung 1, die mindestens ein wasserlösliches Polyanion enthält, in eine wäßrige Lösung 2
10 eingebracht werden, enthaltend

- 0,1 bis 5 Gew-% Calciumkationen; und
- 0,1 bis 5 Gew-% hydrolysiertes Chitosan mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht zwischen 2.200 und 40.000 g/mol, erhältlich durch partielle Hydrolyse eines Chitosans mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht
15 von mehr als 50.000 g/mol in einer wäßrigen, 0,1 bis 4 N HCl enthaltenden Lösung bei einer Temperatur zwischen 50 und 95 °C für eine Dauer zwischen 0,5 und 8 Stunden, wobei das Gewichtsverhältnis von HCl enthaltender Lösung zu handelsüblichem Chitosan zwischen 1 und 50 liegt und das Produkt von Normalität der HCl-Lösung und der Hydrolysedauer
20 in Stunden zwischen 0,1 und 7 liegt; und

b) nach Beendigung der Zugabe der Lösung 1 für eine Dauer von 15 bis 360 Minuten, insbesondere für eine Dauer von 60 bis 180 Minuten, die so erhaltenen Mikrokapseln in der Lösung 2 verbleiben.

25 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikrokapseln zeigen gegenüber den chitosanhaltigen Mikrokapseln des Standes der Technik eine deutlich verringerte Permeabilität. Der Release der erfindungsgemäß hergestellten Mikrokapseln liegt nach 10 Tagen Messung immer noch unter 50 % (Wirkstoff: Rinderserumalbumin).
Darüber hinaus hat das erfindungsgemäße Verfahren den Vorteil, daß die Herstellung
30 der Mikrokapseln in einem einzigen Verfahrensschritt erfolgt. Es entfallen somit die aufwendigen Vorrichtungen, die bei den mehrstufigen Verfahren des Standes der Technik zum Transport der Mikrokapseln bisher notwendig waren.

5

Die wäßrige Lösung 1 kann durch an sich bekannte Verfahren in Flüssigkeitströpfchen überführt werden. Insbesondere können hierfür handelsübliche Zerstäuber verwendet werden.

- 5 Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn das wasserlösliche Polyanion ein Alginat ist, insbesondere ein Alginat mit hohem Guluronsäuregehalt.

Das wasserlösliche Polyanion kann aber auch ausgewählt sein aus der Gruppe von Carrageenan, sulfatierten Polysacchariden, Gelatine und Agar-Agar.

- 10 Entsprechend einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die Lösung 1 zusätzlich mindestens eine Polysäure oder deren Alkalisalz, ausgewählt aus der Gruppe von Polyaminosäuren, Polyphosphaten und Polysulfaten von Polysacchariden.

- Bevorzugte Beispiele für ein Polyphosphat sind Natriumpolyphosphat und ein Polyphosphat eines Polysaccharids.

Das Polysaccharid kann ausgewählt sein aus der Gruppe von Stärkehydrolysaten, Inulin, Hydroxyethylstärke, Xylan und Dextranen.

Als Polyaminosäure ist bevorzugt Polyasparaginsäure oder Polyglutaminsäure zu verwenden.

- 20 Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung enthält die Lösung 2 zusätzlich ein Polykation, ausgewählt aus der Gruppe von Polylysin, Polyvinylamin, Poly- α,β -(2,2-dimethylaminoethyl)-D,L-aspartamid, aminierten Polysacchariden, wie z.B. aminierten Dextranen, Cyclodextrinen, Celluloseethern, Stärken, Pektinen, sowie deren hydrophob substituierten Derivaten.

- Der Release kann darüber hinaus reduziert werden, indem man nach der Partikelherstellung die Mikrokapseln in einem zusätzlichen Verfahrensschritt mit einem Vernetzer umsetzt, ausgewählt aus der Gruppe von Glyoxal, Glutardialdehyd, Bernsteinsäuredialdehyd, oder Dicarbonsäuren, wie beispielsweise Oxalsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Äpfelsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, 2,3-O-Isopropylidenweinsäure, Disäurechloriden, wie beispielsweise Bernsteinsäurechloro-

rid, Fumarsäurechlorid, Glutarsäurechlorid, Adipinsäurechlorid, oder Tricarbonsäuren, wie beispielsweise Citronensäure, 1,2,3-Propantricarbonsäure, Hemimellithsäure, Trimellithsäure, Trimesinsäure.

- 5 Die Größe der erfindungsgemäß hergestellten Mikrokapseln liegt zwischen 1 und 3.000 μm , insbesondere zwischen 10 und 1.000 μm .

Die erfindungsgemäßen Mikrokapseln finden bevorzugt Verwendung als Träger für Wirkstoffe, insbesondere für Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Aromen,
10 Duftstoffe, Farbstoffe, Herbizide, Fungizide, Bakterizide, Pestizide und Insektizide.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1

15

Herstellung der Lösung 1:

9 mg Natrium Alginat von der Firma Sigma (Katalog-Nr.: A-7128) zusammen mit 6 mg BSA-FITC (von der Firma Sigma, Katalog-Nr.: A-9771) werden in 3 ml 0,9% NaCl-Lösung gelöst.

20

Herstellung der Lösung 2:

In einem 4 l Zweihalskolben, ausgestattet mit einem Kühler, werden 1500 ml 1,0 M Salzsäure auf 90°C erwärmt. Anschließend werden 60 g Chitosan (erhältlich unter der Bezeichnung Chitosan von der Firma Fluka, Katalog-Nr.: 22743) langsam unter
25 Rühren zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wird die Reaktionsmischung 4 Stunden lang bei 90 °C gerührt und anschließend durch eine G2-Fritte filtriert. Das erhaltene Filtrat wird über Nacht in einem Kühlschrank bei 2-8 °C stehengelassen. Der auf diese Weise erhaltene Niederschlag wird durch Zentrifugation (Lobofuge GL von Heraeus; bei 4500 U/Min, 25 Min) isoliert. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und
30 mit Hilfe einer Gefriertrocknungs-Vorrichtung (LDC-1m der Firma Christ) gefriergetrocknet.

300 mg des so hergestellten Chitosan wird zusammen mit 450 mg CaCl_2 (von der Firma Riedel deHaen, Katalog-Nr.: 12018) in 15 ml Wasser gelöst.

Herstellung der Mikrokapseln:

- 5 Die Lösung 1 wird mittels einer Düse, die aus einer Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm und einem Außendurchmesser von 0,4 mm besteht, in die Lösung 2 eingetropft. Die Düse ist konzentrisch in einen Hohlzylinder eingelassen, so daß über den entstehenden Ringspalt ein tangentialer Luftstrom erzeugt werden kann, der die aus der Kanüle austretenden Tropfen mitreißt. Die so erzeugten Tropfen fallen in die Lösung 2.

- 10 Nachdem 1 ml der Lösung 1 in 15 ml der Lösung 2 eingebracht wurden, läßt man die entstandenen Mikrokapseln sedimentieren und dekantiert die Lösung ab. Anschließend suspendiert man die erhaltenen Mikrokapseln dreimal mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung. Die häufigste Größe der auf diese Weise hergestellten Mikrokapseln wurde
- 15 durch Fraunhoferbeugung bestimmt und betrug 90µm.

Bestimmung der Wirkstofffreisetzung:

- Zur Bestimmung der Release Eigenschaften der hergestellten Kapseln wird als Modell-Protein BSA-FITC der Firma Sigma (Katalog-Nr.: A-9771) verwendet. Weitere
- 20 Materialien sind: Natrium-Alginat von Sigma (A-7128), Chitosan von Fluka (22743), CaCl_2 von Riedel de Haen (12018), NaCl von Merck (6404).

Die Releasemessungen werden in PBS Puffer (Sigma, P4417), mit zusätzlich 0,005% Timerosol (der Firma Fluka, Katalog-Nr.:71230), durchgeführt.

- Die PEC-Kapseln werden nach der Herstellung in 10 ml PBS-Pufferlösung, in 15ml
- 25 Rollrandgläschen, überführt und die Mikrokapseln werden bei 37°C inkubiert.

- Die Messung der BSA-FITC Konzentration erfolgten mittels eines UV/VIS Spektrophotomer der Firma Beckmann (DU 70). Zuerst wird der Anteil an eingeschlossenem BSA-FITC bestimmt, indem in den vereinigten Überständen die BSA-FITC-
- 30 Konzentration bestimmt wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Messung der Absorption bei 494 nm unter Benutzung einer Eichkurve. Eine Verfälschung der Messung durch die Eigenfärbung des Chitosans wird umgangen, indem die Absorp-

tion des Chitosans abgezogen wird. Aus der eingesetzten Menge an BSA-FITC kann berechnet werden, wieviel von dem BSA-FITC eingeschlossen wurde.

Die Releasemessung erfolgt, indem 3 ml aus der Inkubationslösung entnommen wird
5 und an diesem Überstand die BSA-FITC Konzentration bestimmt wird. Nach Beendi-
gung der Messung wird die Probenlösung wieder mit der Releaseprobe vereint.
Der Release der auf diese Weise erhaltenen Mikrokapseln beträgt nach 11 Tagen
nur 20 % des eingekapselten Wirkstoffes.

10 **Beispiel 2**

Die Durchführung erfolgt analog zu Beispiel 1. Nach der Mikropartikelherstellung
werden die Partikel mit Glyoxal vernetzt. Hierzu werden die Mikropartikel für 30 Mi-
nuten in 10 ml einer 2 Gew-% Glyoxallösung eingebracht und stehen gelassen. An-
schließend werden sie mit 0,9 % NaCl Lösung gewaschen.

15 Der Release der auf diese Weise erhaltenen Mikrokapseln beträgt nach 45 Tagen
weniger als 10 % des eingekapselten Wirkstoffes.

Patentansprüche

- 1.) Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln, dadurch gekennzeichnet, daß
- 5 a) in einem Verfahrensschritt Flüssigkeitströpfchen einer wäßrigen Lösung 1, die mindestens ein wasserlösliches Polyanion enthält, in eine wäßrige Lösung 2 eingebracht werden, enthaltend
- 0,1 bis 5 Gew-% Calciumkationen; und
 - 0,1 bis 5 Gew-% hydrolysiertes Chitosan mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht zwischen 2.200 und 40.000 g/mol, erhältlich durch
- 10 partielle Hydrolyse eines Chitosans mit einem zahlenmittleren Molekulargewicht von mehr als 50.000 g/mol in einer wäßrigen, 0,1 bis 4 N HCl enthaltenden Lösung bei einer Temperatur zwischen 50 und 95 °C für eine Dauer zwischen 0,5 und 8 Stunden, wobei das Gewichtsverhältnis von HCl enthaltender Lösung zu handelsüblichem
- 15 Chitosan zwischen 1 und 50 liegt und das Produkt von Normalität der HCl-Lösung und der Hydrolysedauer in Stunden zwischen 0,1 und 7 liegt; und
- b) nach Beendigung der Zugabe der Lösung 1 für eine Dauer von 15 bis 360 Minuten, insbesondere für eine Dauer von 60 bis 180 Minuten, die so erhaltenen Mikrokapseln in der Lösung 2 verbleiben.
- 20
- 2.) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Polyanion ein Alginat, insbesondere ein Alginat mit hohem Guluronsäuregehalt, ist.
- 25
- 3.) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Polyanion ausgewählt ist aus der Gruppe von Carrageenan, sulfatierten Polysacchariden, Gelatine und Agar-Agar.
- 30 4.) Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 1 zusätzlich mindestens eine Polysäure oder deren Alkalisalz enthält, ausgewählt aus der Gruppe von Polyaminosäuren, Polyphosphaten

und Polysulfaten von Polysacchariden.

5.) Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyphosphat Natriumpolyphosphat oder ein Polyphosphat eines Polysaccharids ist.
- 5 6.) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid ausgewählt ist aus der Gruppe von Stärkehydrolysaten, Inulin, Hydroxyethylstärke, Xylan und Dextranen.
- 10 7.) Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyaminosäure Polyasparaginsäure oder Polyglutaminsäure ist.
8.) Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 2 zusätzlich ein Polykation enthält, ausgewählt aus der Gruppe von Polylysin, Polyvinylamin, Poly- α,β -(2-Dimethylaminoethyl)-D,L-aspartamid, aminierten Polysacchariden, wie z.B. aminierten Dextranen, Cyclodextrinen, Celluloseethern, Stärken, Pektinen, sowie deren hydrophob substituierten Derivaten.
- 15 9.) Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln in einem zusätzlichen Verfahrensschritt mit einem Vernetzer umgesetzt werden, ausgewählt aus der Gruppe von Glyoxal, Glutardialdehyd, Bernsteinsäuredialdehyd, oder Dicarbonsäuren, wie beispielsweise Oxalsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Äpfelsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, 2,3-O-Isopropylidenweinsäure, Disäurechloriden, wie beispielsweise Bernsteinsäurechlorid, Fumarsäurechlorid, Glutarsäurechlorid, Adipinsäurechlorid, oder Tricarbonsäuren, wie beispielsweise Citronensäure, 1,2,3-Propantricarbonsäure, Hemimellithsäure, Trimellithsäure, Trimesinsäure.
- 20 10.) Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Mikrokapseln zwischen 1 und 3.000 μm , insbesondere zwischen 10 und 1.000 μm , liegt.
- 30

11

- 11.) Verwendung der nach einem Verfahren der vorherigen Ansprüche hergestellten Mikrokapseln als Träger für Wirkstoffe, insbesondere für Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffe, Aromen, Duftstoffe, Farbstoffe, Herbizide, Fungizide, Bakterizide, Pestizide und Insektizide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 99/01625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MURATA Y ET AL: "ADDITIVE EFFECT OF CHONDROITIN SULFATE AND CHITOSAN ON DRUG RELEASE FROM CALCIUM-INDUCED ALGINATE GEL BEADS" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 38, no. 2/03, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 101-108, XP000558704 ISSN: 0168-3659	11
A	page 102 --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13. August 1999

Date of mailing of the international search report

30/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Boulois, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 99/01625

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKHAMAFE A O ET AL: "MODULATION OF PROTEIN RELEASE FROM CHITOSAN-ALGINATE MICROCAPSULES USING THE PH-SENSITIVE POLYMER HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE ACETATE SUCCINATE" JOURNAL OF MICROENCAPSULATION, vol. 13, no. 5, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 497-508, XP000599283 ISSN: 0265-2048	11
A	page 498 - page 500	1
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9342 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-331371 XP002112138 & JP 05 238957 A (KIBUN FOOD CHEMIFA KK), 17 September 1993 (1993-09-17)	11
A	abstract	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 008, no. 178 (C-238), 16 August 1984 (1984-08-16) & JP 59 074984 A (SUMITOMO KAGAKU KOGYO KK), 27 April 1984 (1984-04-27)	1,11
A	abstract	
A	-& DATABASE WPI Section Ch, Week 8423 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A10, AN 84-143230 XP002112139 & JP 59 074984 A (SUMITOMO CHEM CO LTD)	1,11
A	abstract	
A	POLK A. ET AL: "Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules" J. OF PHARM. SCIENCES , vol. 83, no. 2, 1994, pages 178-185, XP002112136 cited in the application page 179 page 180; table 2 page 181; table 5	1,11
A	MC KNIGHT C.A. ET AL: "Synthesis of Chitosan-alginate microcapsules membranes" J. OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, vol. 3, 1988, pages 334-355, XP002112137 cited in the application page 344; table 3 page 345; table 4	1,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/EP 99/01625

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 5238957 A	17-09-1993	JP 2511612 B	03-07-1996
JP 59074984 A	27-04-1984	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 99/01625

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K9/16

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MURATA Y ET AL: "ADDITIVE EFFECT OF CHONDROITIN SULFATE AND CHITOSAN ON DRUG RELEASE FROM CALCIUM-INDUCED ALGINATE GEL BEADS" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 38, Nr. 2/03, 1. Februar 1996 (1996-02-01), Seiten 101-108, XP000558704 ISSN: 0168-3659	11
A	Seite 102 ----- -/--	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. August 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/08/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Boulois, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch: Nr.
X	OKHAMAFÉ A O ET AL: "MODULATION OF PROTEIN RELEASE FROM CHITOSAN-ALGINATE MICROCAPSULES USING THE PH-SENSITIVE POLYMER HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE ACETATE SUCCINATE" JOURNAL OF MICROENCAPSULATION, Bd. 13, Nr. 5, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 497-508, XP000599283 ISSN: 0265-2048	11
A	Seite 498 - Seite 500 ---	1
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9342 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-331371 XP002112138 & JP 05 238957 A (KIBUN FOOD CHEMIFA KK), 17. September 1993 (1993-09-17)	11
A	Zusammenfassung ---	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 008, no. 178 (C-238), 16. August 1984 (1984-08-16) & JP 59 074984 A (SUMITOMO KAGAKU KOGYO KK), 27. April 1984 (1984-04-27)	1,11
A	Zusammenfassung -& DATABASE WPI Section Ch, Week 8423 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A10, AN 84-143230 XP002112139 & JP 59 074984 A (SUMITOMO CHEM CO LTD) Zusammenfassung ---	1,11
A	POLK A. ET AL: "Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules" J. OF PHARM. SCIENCES, Bd. 83, Nr. 2, 1994, Seiten 178-185, XP002112136 in der Anmeldung erwähnt Seite 179 Seite 180; Tabelle 2 Seite 181; Tabelle 5 ---	1,11
A	MC KNIGHT C.A. ET AL: "Synthesis of Chitosan-alginate microcapsules membranes" J. OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS, Bd. 3, 1988, Seiten 334-355, XP002112137 in der Anmeldung erwähnt Seite 344; Tabelle 3 Seite 345; Tabelle 4 -----	1,11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. des Abkürzungen

PCT/EP 99/01625

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 5238957 A	17-09-1993	JP 2511612 B	03-07-1996
JP 59074984 A	27-04-1984	KEINE	